



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Jana Gašperov

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SPREGNUTI SUSTAVI U ANALIZI LIJEKOVA

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za analitičku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Zagreb, 2018.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

6. srpnja 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

21. rujna 2018.

Mentor rada: prof. dr. sc. Predrag Novak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. KROMATOGRAFIJA	2
2.1. Razvoj kromatografije.....	2
2.2. Vrste kromatografije	2
2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	3
§ 3. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCIJA.....	4
3.1. Spektroskopske metode	4
3.2. Nuklearna magnetna rezonancija.....	5
3.2.1. Pulsevi.....	5
3.2.2. Spektar NMR.....	5
§ 4. SPEKTROMETRIJA MASA	8
4.1. Ioniziranje uzorka.....	9
4.1.1. Ionizacija elektronima.....	9
4.1.2. Kemijska ionizacija.....	10
4.1.3. Ionizacija elektroraspršenjem	10
4.1.4. Matricom potpomognuta ionizacija iz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)	11
4.2. Analizatori mase.....	12
§ 5. SPREGNUTI SUSTAVI.....	15
5.1. Vrste spregnutih sustava	15
5.2. LC-NMR	15
5.2.1. Načini izvedbe spregnutog sustava LC-NMR	15
5.2.2. Ograničenja i nedostaci spregnutog sustava LC-NMR.....	16
5.3. LC-SPE-NMR.....	17
5.4. LC-MS.....	19
5.4.1. Načini izvedbe spregnutog sustava LC-MS.....	19
5.4.2. Nedostaci spregnutog sustava LC-MS	20
5.5. LC-NMR-MS.....	21
5.5.1. Razvoj spregnutog sustava LC-NMR-MS.....	21
5.5.2. Prednosti spregnutog sustava LC-NMR-MS pred sustavima LC-NMR/LC-MS	21
5.5.3. Područja primjene spregnutog sustava LC-NMR-MS	22

5.5.4. Način izvedbe spregnutog sustava LC-NMR-MS.....	22
§ 6. ZAKLJUČAK	24
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	25

§ Sažetak

Lijekovi, prirodni ili sintetski, postaju svakodnevnicom života. Njihov razvoj u zadnjih par godina bilježi veliki rast. Korištenjem različitih tehnika analize lijekova mogu se dobiti podaci o mogućim onečišćenjima, nusproduktima ili međuproduktima. Poznavanje onečišćenja već u prvim fazama istraživanja lijeka bitni su jer mogu pomoći pri objašnjenju nuspojava i moguće toksičnosti lijeka te mogu objasniti mehanizme same sinteze lijeka.

Spregnuti sustavi koriste se sve češće u modernoj analitičkoj kemiji. Spregnuti sustavi danas se koriste u prehrambenoj industriji, agroindustriji i kemijskoj industriji.¹ Najčešće tehnike koje se koriste za sprezanje jesu kromatografija, nuklearna magnetna rezonancija i spektrometrija masa. U ovom radu biti će objašnjeno kako funkcioniraju navedene tehnike samostalno i načini na koje se mogu sprežati. Najčešća sprežanja su tekućinska kromatografija spregnuta s nuklearnom magnetnom rezonancijom (LC-NMR), tekućinska kromatografija spregnuta s spektrometrom masa (LC-MS) i tekućinska kromatografija spregnuta s nuklearnom magnetnom rezonancijom i spektrometrom masa (LC-NMR-MS).

§ 1. UVOD

Ima li u lijekovima još nečega osim potrebnih tvari za izlječenje pojedine bolesti? Novija analitička istraživanja više se bave proučavanjem nusprodukata, međuprodukata i mogućih onečišćenja lijeka.¹⁻⁴ Potrebno je koristiti više odgovarajućih analitičkih tehnika da bi se dobili što precizniji i točniji rezultati. Analize onečišćenja lijekova mogu uvelike doprinijeti unapređenju vrste lijeka. Fokus pri analizi lijekova su onečišćenja lijekova, a dodatna pažnja se posvećuje geotoksičnim nečistoćama. Neka onečišćenja mogu prouzročiti negativne nuspojave, mutacije ili čak mogu biti i kancerogena.²

Tehnike poput kromatografije, nuklearne magnetske rezonancije i spektrometrije mase uvelike doprinose analizi lijekova u farmaceutskoj industriji. Različitim sprežanjem navedenih tehnika postiže se unapređenje pojedinih te se znatno može ubrzati postupak analize.

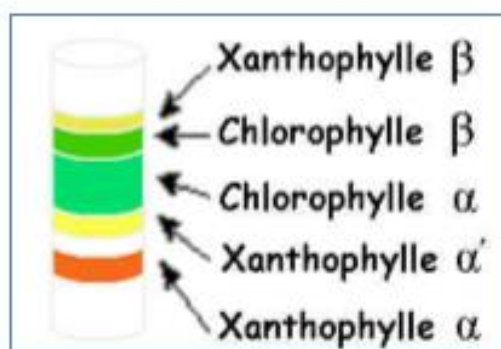
Najčešće se povezuju tehnike tekućinska kromatografija i spektrometrija masa (LC-MS), tekućinska kromatografija i nuklearna magnetska rezonancija (LC-NMR) te tekućinska kromatografija, nuklearna magnetska rezonancija i spektrometrija masa (LC-NMR-MS).

§ 2. KROMATOGRAFIJA

2.1. Razvoj kromatografije

1906. Mihail Semanovič Cvet, ruski botaničar, objasnio je načela tada nepoznate tehnike, kromatografije na stupcu. U svom eksperimentu koristio je staklenu kolonu, sitnozrnasti CaCO_3 i otopinu biljnih pigmenata ksantofila i klorofila. Kao rezultat eksperimenta Cvet je dobio obojene vrpce u bojima pojedinih pigmenata.

Danas je kromatografija jedna od najčešće primjenjivih metoda u farmaceutskoj industriji, ali i u industriji općenito.



Slika 1. Rezultati ruskog botaničara pri izvedbi kromatografije na stupcu.

2.2. Vrste kromatografije

Kromatografija se temelji na razdvajanju komponenti smjese između dvije faze. Faze se dijele na stacionarnu i mobilnu. Stacionarna faza (sorbens) je nepokretna faza koja može biti krutina, gel ili tekućina. Također nepokretna faza može biti smještena u usku cijev kroz koju će se propuštati mobilna faza ili može biti nanesena na plohu. Mobilna faza (eluens) je pokretna faza te može biti tekućina ili plinovita tvar. Ime pojedine vrste kromatografije određuje agregatno stanje mobilne faze (Tablica 1).

Tablica 1: Podjela kromatografije prema agregatnom stanju mobilne faze

KROMATOGRAFIJA	AGREGATNO STANJE MOBILNE FAZE	AGREGATNO STANJE STACIONARNE FAZE
LS kromatografija	tekućina	krutina
LL kromatografija	tekućina	tekućina
GS kromatografija	plin	krutina
GL kromatografija	plin	tekućina

Osim po agregatnom stanju mobilne faze, kromatografija se može podijeliti i prema različitim fizikalno – kemijskim svojstvima poput vrelišta, adsorpcije, topljivosti i slično.

U analizi bioloških makromolekula najčešće se koriste tri glavne tehnike: kromatografija na ionskim izmjenjivačima, afinitetna kromatografija i gel-filtracija. Kromatografija na ionskim izmjenjivačima temelji se na različitim nabojima molekula u sustavu. Afinitetna kromatografija temelji se na različitim afinitetima proteina prema različitim manjim molekulama. Gel-filtracijska kromatografija temelji se na različitoj veličini molekula.

2.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

U zadnje vrijeme ulažu se naponi za poboljšavanje klasičnih kromatografskih metoda. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*) odnosno HPLC najviše je korištena kromatografska metoda.⁵ Odjeljivanje je poboljšano korištenjem stupaca s visokim razlučivanjem i kraćim vremenom kromatografije. Tlak koji se koristi u analizi produkata tehnikom HPLC dostiže vrijednosti i do 35 MPa.⁶ Također, HPLC je tehnika koja ima visoku osjetljivost te je moguće automatizirati cijeli sustav.

§ 3. NUKLEARNA MAGNETNA REZONANCIJA

3.1. Spektroskopske metode

Metode temeljene na interakciji tvari i elektromagnetskog zračenja nazivaju se spektroskopske metode.⁷ Elektromagnetno zračenje može se opisati kao struja fotona i kao val. Elektromagnetni valovi mogu se širiti i u vakuumu tj. nije im potreban prijenosni medij. Zbog navedene dvojne prirodne elektromagnetnog zračenja mogu se objasniti apsorpcija, emisija ili raspršenje zračenja uslijed interakcije s tvari. Energija fotona dana je jednadžbom $\Delta E = h\nu = hc \frac{1}{\lambda}$, odnosno energija fotona proporcionalna je frekvenciji (ν), a obrnuto proporcionalna valnoj duljini (λ). Do prijelaza u spektru može doći samo ukoliko je energija zračenja jednaka energiji prijelaza.⁷

Područja elektromagnetskog zračenja prikazana su Tablici 2.⁷

Tablica 2: Područja spektra elektromagnetskog zračenja

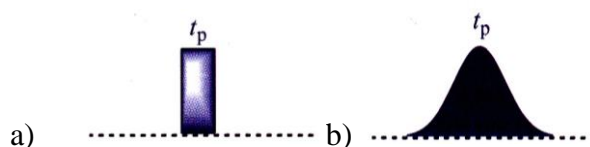
$E / \text{kJ mol}^{-1}$		λ / cm	ν / Hz	
$> 10^5$	γ -zračenje	$> 10^{-8}$	10^{16}	nuklearni prijelazi
$10^3 - 10^5$	rendgensko zračenje	$10^{-8} - 10^{-6}$	$10^{14} - 10^{16}$	prijelazi unutarnjih elektrona
$10^1 - 10^3$	ultraljubičasto zračenje	$10^{-6} - 10^{-4}$	$10^{12} - 10^{14}$	prijelazi vanjskih elektrona
	vidljivo zračenje			
$10^{-1} - 10^1$	infracrveno zračenje	$10^{-4} - 10^{-2}$	$10^{10} - 10^{12}$	vibracije
$10^{-5} - 10^{-1}$	mikrovalno zračenje	$10^{-2} - 10^2$	$10^6 - 10^{10}$	rotacije
$< 10^{-5}$	radiovalno zračenje	$> 10^2$	$< 10^6$	prijelazi među spinskim stanjima

3.2. Nuklearna magnetna rezonancija

Za određivanje strukture manjih molekula i makromolekula može se koristiti sprektroskopija NMR (engl. *Nuclear magnetic resonance spectroscopy*). Spektroskopijom NMR proučavaju se jezgre čiji su spinovi različiti od nule kao npr. ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P .⁷

3.2.1. Pulsevi

Spinovi jezgri mogu se pobuditi dvjema vrstama pulseva: radiofrekvencijskim pulsevima i gradijentnim pulsevima. Radiofrekvencijski pulsevi dijele se na kratke odnosno tvrde pulseve i duge odnosno meke pulseve. Ukoliko se želi pobuditi sve jezgre koriste se tvrdi pulsevi, a ukoliko se želi selektivna pobuda spinova jezgri koriste se meki pulsevi zbog njihove selektivnosti, pa se još zovu i selektivni pulsevi. Sheme radiofrekvencijskih pulseva prikazane su na slici 2.

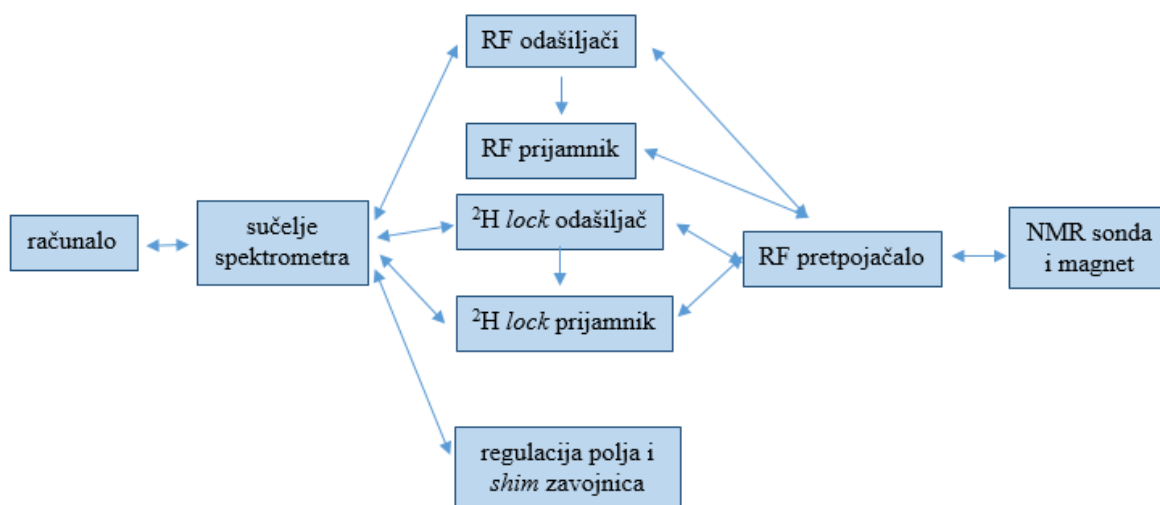


Slika 2. Sheme radiofrekvencijskih pulseva: a) tvrdi/kratki puls, b) meki/dugi puls

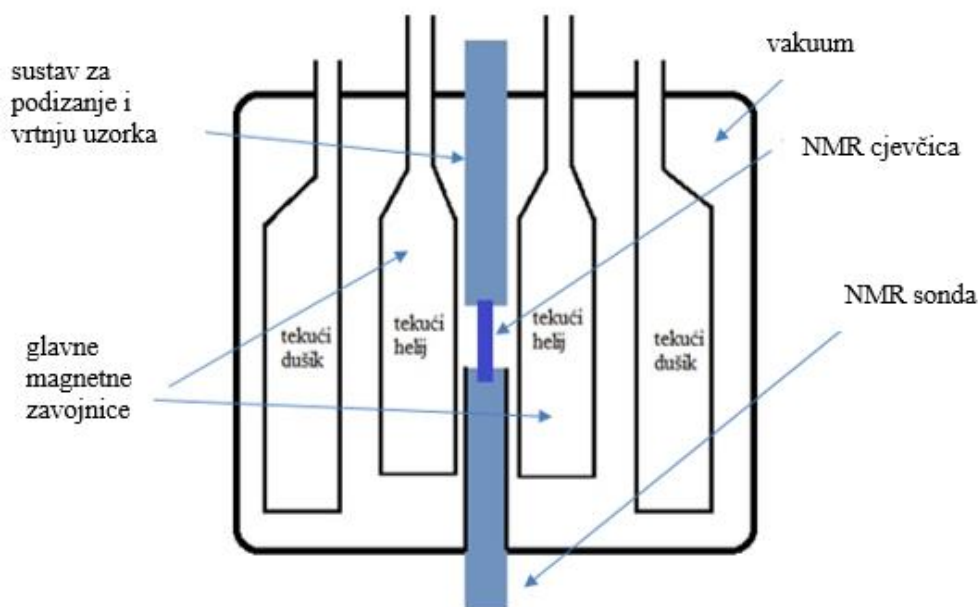
Gradijentni pulsevi koriste dodatno defazirajuće magnetno polje koje se mijenja duž z osi. Oni se najčešće koriste za selekciju koherencije te u pulsnim sljedovima za određivanje translacijske difuzije.

3.2.2. Spektar NMR

Uređaj koji se koristi za snimanje spektara NMR naziva se spektrometar NMR. Dijelovi spektrometra su: supravodljiv magnet, sonda sa cjevčicom za uzorak, zavojnice i elektronika za povezivanje spektrometra NMR i računala. Shema spektrometra prikazana je na slici 3. Unutrašnjost magneta prikazana je slikom 4.



Slika 3. Shematski prikaz glavnih komponenti spektrometra NMR.



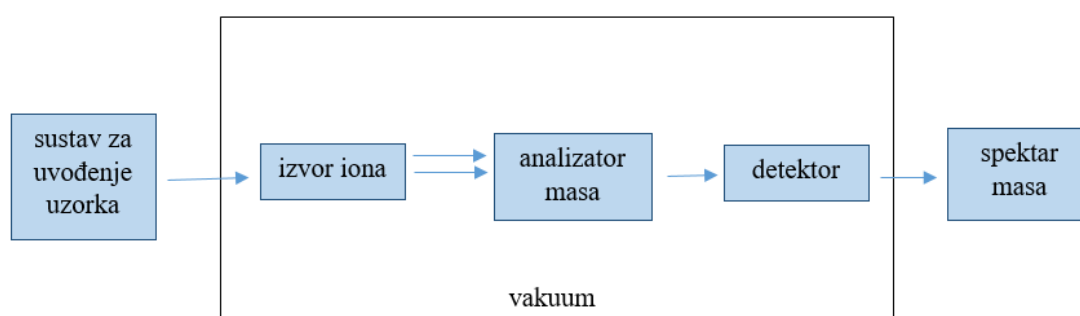
Slika 4. Unutrašnjost magneta spektrometra NMR.

Snimanje spektra NMR željenog uzorka vrši se u 5 mm cilindričnoj cijevčici NMR. Željeni uzorak otopljen je u 0,5 ml denaturiranog otapala.⁸ Deuterirano otapalo koristi se jer ^2H nema signal u spektru ^1H NMR i stoga se vide samo signali željenog uzorka. Također, bitno je znati hoće li otapalo utjecati na međumolekulske interakcije u otopini, a time posljedično i na izgleda spektra NMR.

Krio tehnologija, sve češća metoda u spektroskopiji NMR, sadrži dio elektronike na $T \approx 20\text{K}$ što rezultira povećanjem omjera signala i šuma. Pomoću krio tehnologije moguća je detekcija željenog uzorka kojeg ima vrlo malo u biološkom uzorku. Također, krio tehnologijom postiže se i bolje osjetljivost instrumenta.⁴

§ 4. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa, za razliku od prethodno navedene spektroskopije NMR, temelji se na ionizaciji željenog uzorka, na njegovoj fragmentaciji, odabiru ioniziranih fragmenata te njihovoj detekciji. Shema spektrometra prikazana je na slici 5.



Slika 5. Shema spektrometra masa.

Ioniziranjem željenog uzorka nastaje molekulski radikal ion ili ion prekursor: $M + e^- \rightarrow M^{\bullet+} + 2e^-$. Dobiveni molekulski ion je nestabilan i pun energije. Molekulski radikal ion dalje se podvrgava fragmentaciji te nastaju produkti ioni.⁹ Fragmentacijom se mogu dobiti ili produkti ion s parnim brojem elektrona i radikal ili produkti ion s neparnim brojem elektrona i neutralna molekula. Nadalje, ioni se razdvajaju temeljem omjera mase i naboja (m/z) te se zatim detektiraju.

Spektrometriju masa moguće je spregnuti s drugim analitičkim tehnikama poput tekućinske kromatografije spregnute s spektrometrijom masa. Navedeni spregnuti sustav, LC-MS, od velike je važnosti u analizi i identifikaciji lijekova, razgradnih produkata, međuprodukata i onečišćenja lijekova.

4.1. Ioniziranje uzorka

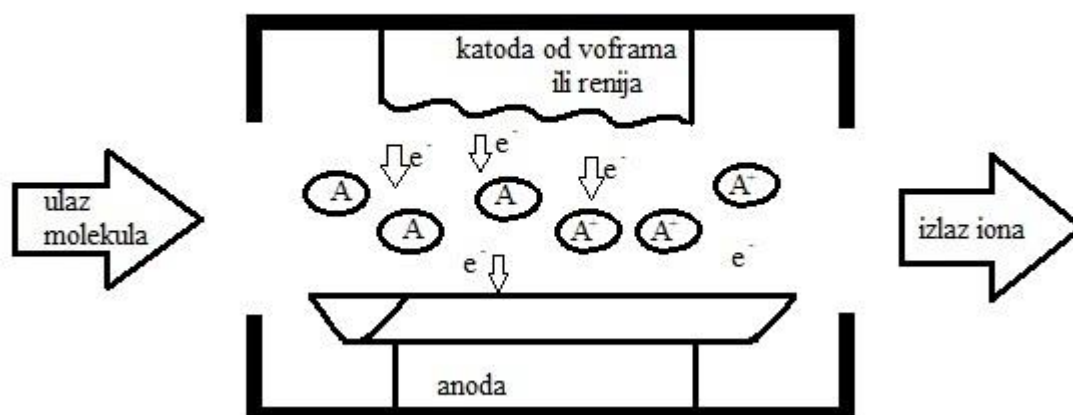
Ionizacija je prvi korak u spektrometriji masa. Ovisno o tehnici ionizacije fragmentacija u spektrima masa bit će različita. Također, ovisno o vrsti i prirodi istraživane molekule ovisiti će odabir tehnike ionizacije. U tablici 3. prikazane su neke od tehnika ionizacije. Najčešće korištene tehnike su istaknute debljim slovima.

Tablica 3. Tehnike ionizacije

TEHNIKA IONIZACIJE	
ionizacija elektronima (engl. <i>electron inisation</i> , EI)	tehnike koje djelomično ili potpuno fragmentiraju uzorak pogodne za analizu molekula stabilnih ionskih produkata
kemijska ionizacija (engl. <i>chemical ionisation</i> , CI)	
ionizacija brzim elektronima (engl. <i>fast atom bombardment</i> , FAB)	
ionizacija elektroraspršenjem (engl. <i>electrospray ionisation</i> , ESI)	blage ionizacijske tehnike pogodne za analizu nestabilnih makromolekula
termoraspršenje (engl. <i>thermospray</i> , TS)	
matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (engl. <i>matrix assisted laser deorption ionisation</i> , MALDI)	
ionsko raspršenje (engl. <i>ion spray</i> , IS)	

4.1.1. Ionizacija elektronima

Ionizacija elektronima jedna je od najčešće korištenih ionizacijskih tehnika. Grijana katoda od volframa ili renija emitira elektrone, a elektroni se ubrzavaju zbog razlike potencijala između katode i anode. Elektroni se sudaraju s molekulama uzorka te nastaju produkti ioni koji se dalje kreću prema analizatoru masa. Optimalna energija elektrona za fragmentaciju iznosi 70 eV.⁹ Ukoliko je željeni uzorak lako hlapljiv koristi se ionizacija u plinskoj fazi. Proces je prikazan na slici 6.



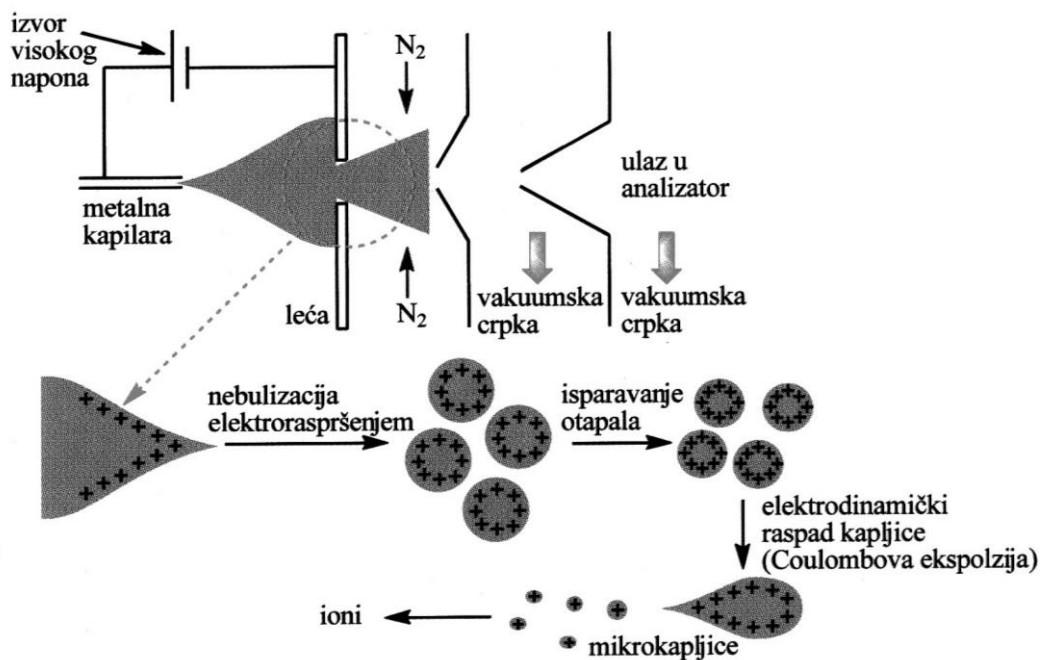
Slika 6. Proces ionizacije elektronima.

4.1.2. Kemijska ionizacija

Kemijska ionizacija je poput ionizacije elektrona jedna od tehnika ionizacije koja je pogodna za analizu molekula stabilnih ionskih produkata. Međutim, fragmenti nastali kemijskom ionizacijom posjeduju manju energiju nego fragmenti nastali ionizacijom brzim elektronima. Kemijska ionizacija sastoji se od procesa u kojem sudjeluje plin reagens te on reagira sa uzorkom. Prilikom interakcije plina reagensa i uzorka nastaju kationi ili anioni. Podvrsta kemijske ionizacije je kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku (engl. *atmospheric pressure chemical ionisation*, APCI).

4.1.3. Ionizacija elektroraspršenjem

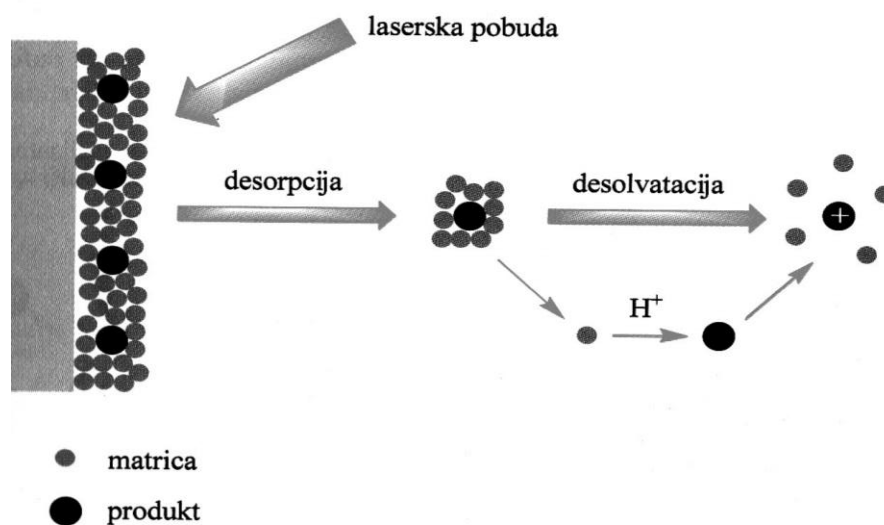
Ionizacija elektroraspršenjem najblaža je tehnika ionizacije za analizu makromolekula. Proces ionizacije elektroraspršenjem uključuje nebulizaciju tekuće faze. Produkti nebulizacije su visoko nabijene kapljice.⁹ Otapalo iz kapljice isparava pod utjecajem dušika – plina za sušenje. Proces je prikazan slikom 7.



Slika 7. Proces ionizacije elektroraspršenjem.

4.1.4. Matricom potpomognuta ionizacija iz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)

Tehnika MALDI vrlo je osjetljiva tehnika, a također pripada skupini tehnika koje su pogodne za analizu makromolekula. Tehnika se sastoji od dva koraka. U prvom koraku uzorak se otapa u organskim molekulama koje se nazivaju matrice. Najčešće korištene matrice jesu: α -cijano-4-hidroksicinamtna kiselina, trihidroksiacetofenon i 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina. Drugi korak sastoji se od ionizacije u vakuumu. Kratkim laserskim pobudama dolazi do desorpcije matrice s uzorkom. Zatim slijedi desolvatacija i ionizacija. Produkti ioni zatim ubrzavaju prema analizatoru masa. Proces je prikazan slikom 8.



Slika 7. Proces ionizacije tehnikom MALDI.

4.2. Analizatori mase

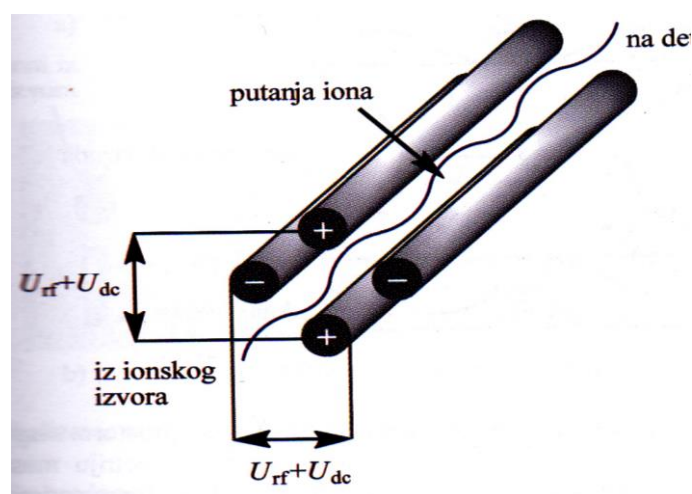
. Analizator masa odvaja nastale ione na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z). Tablicom 4 prikazani su neki tipovi analizatora masa. Bitni parametri za odabir povoljnog analizatora masa jesu: osjetljivost, gornja granica omjera mase i naboja, razlučivanje i točnost mjerenja.⁹

Tablica 4. Razlike i sličnosti pojedinih analizatora masa

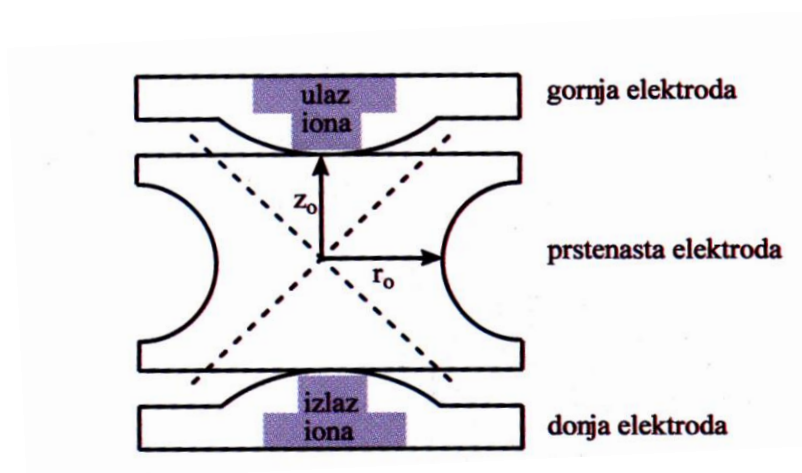
ANALIZATOR MASA	Osjetljivost	Gornja granica m/z	Razlučivost	Točnost mjerenja / u
kvadrupolni analizator mase (engl. <i>quadrupole mass analyzer</i> , Q)	fmol	< 3000	2000 – 3000	0,1
kvadrupolna stupica za ione (engl. <i>ion trap</i> , IT)	fmol	< 5000	2000	0,1
analizator mase vremena leta (engl. <i>time of flight mass analyzer</i> , TOF)	amol	bez ograničenja	5000 - 100000	10^{-4}
analizator mase s magnetnim sektorom (engl. <i>magnetic sector mass analyzer</i> , B)	fmol	< 15000	5000 – 100000	10^{-4}

analizator mase ionsko-ciklotronske rezonancije uz Fourierovu transformaciju (engl. <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i> , FT-ICR)	amol	< 10000	$> 10^6$	10^{-5}
orbitrap uz Fourierovu transformaciju (engl. <i>Fourier transform orbitrap</i> , FT-OT)	amol	< 6000	> 150000	10^{-4}

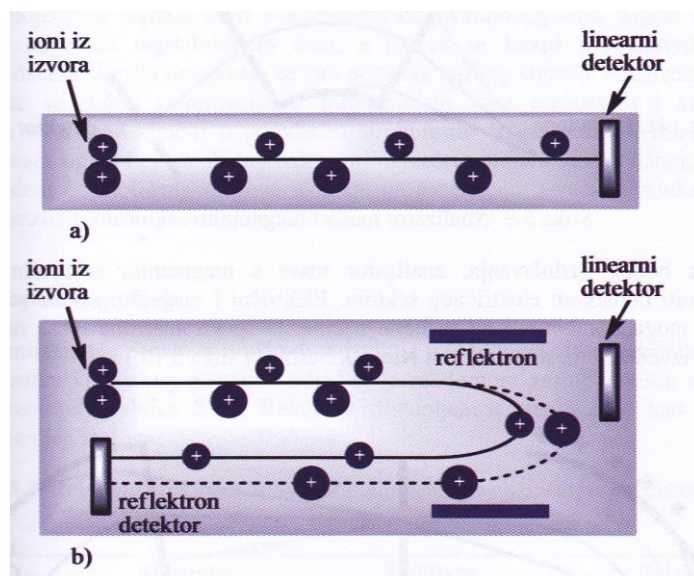
Najčešći analizatori masa prikazani su na slikama 9. – 12.



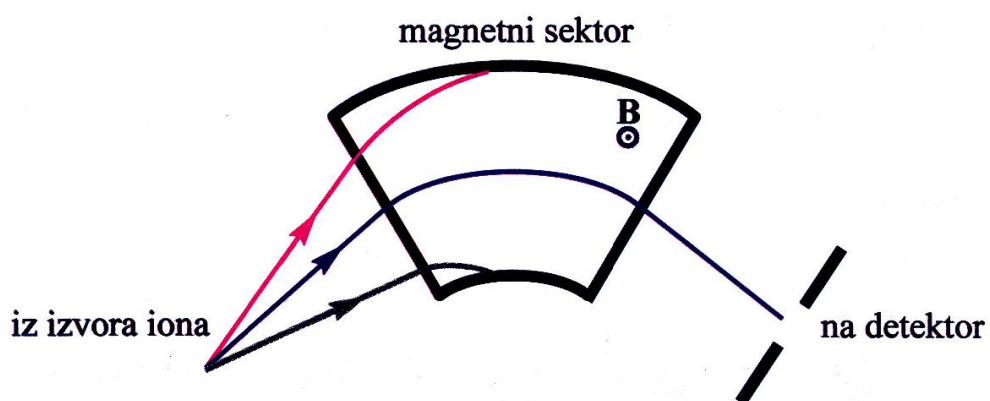
Slika 9. Kvadrupolni analizator mase.



Slika 10. Kvadrupolna stupica za ione.



Slika 11. Analizator mase vremena leta: a) bez reflektрона, b) uz primjenu reflektрона.



Slika 12. Analizator mase s magnetnim sektorom.

§ 5. SPREGNUTI SUSTAVI

S ciljem boljeg i učinkovitijeg analiziranja smjese spojeva danas se koriste spregnuti sustavi (engl. *hyphenated systems*). Njihove prednosti su te što mogu identificirati uzorak, odrediti mu strukturu i količinu. Sprezati se mogu dvije ili više tehnika poput tekućinske kromatografije i spektrometra masa (LC-MS) ili tekućinske kromatografije i nuklearne magnetne rezonancije (LC-NMR). Također, moguće je i sprežanje više od dvije tehnike kao na primjer spregnuti sustav tekućinske kromatografije, nuklearne magnetne rezonancije i spektrometra masa (LC-NMR-MS). Ne moraju se nužno samo sprežati navedene tri tehnike, moguće je sprežati sustav tehnika poput plinske kromatografije i infracrvene spektroskopije s već navedenim tehnikama: GC-IR, LC-IR, GC-MS, CE-MS, SFC-MS, LC-FTIR.²

Jedne od važnijih primjena spregnutih sustava jesu analiza lijekova te određivanje onečišćenja u lijekovima.¹

5.1. Vrste spregnutih sustava

Općenito, spregnuti sustavi sadrže jednu tehniku koja će odijeliti sastojke smjese i drugu tehniku koja će odijeljene uzorke detektirati. Kromatografije – plinska i tekućinska – dobar su odabir za odjeljivanje željenih uzoraka u složenim smjesama. Također, mogu se koristiti i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE). Kao tehnike detekcije najčešće se koriste spektrometrija masa (MS) i nuklearna magnetna rezonancije (NMR). Osim navedenih tehnika detekcije mogu se koristiti i spektrofлуorimetrija, infracrvena spektroskopija i slično.¹⁰

5.2. LC-NMR

Prednosti nuklearne magnetne rezonancije pred ostalim analitičkim tehnikama su potrebna mala količina uzorka te mnoštvo informacija o strukturi (kemijski pomaci, multiplicitet i slično). Također, jedna od velikih prednosti je i to što je tehnika nedestruktivna.

Spregnuti sustav svoju primjenu nalazi u analizi prirodnih produkata, hrane, onečišćenja u lijekovima te metabolita lijekova.¹⁰

5.2.1. Načini izvedbe spregnutog sustava LC-NMR

Nekoliko je načina na koje se može izvesti spregnuti sustav LC-NMR. Načini izvedbe jesu: tehnika kontinuiranog protoka, tehnika zaustavljenog protoka, tehnika skladištenja pikova u kapilarnim petljama te tehnika skladištenja pikova na krutom nosaču.¹⁰

Ipak najčešće korištena tehnika je tehnika zaustavljenog protoka. U toj tehnici uzorak je stacionaran jer čim se napuni protočna ćelija spektrometra NMR željenim uzorkom protok se automatski zaustavi.

Tijekom kromatografske analize potrebno je koristiti smjesu nedeuteriranog i deuteriranog otapala kao pokretna faza. U praksi se najčešće koristi smjesa acetonitrila (CH_3CN) i deuterirane vode (D_2O)¹⁰

5.2.2. Ograničenja i nedostaci spregnutog sustava LC-NMR

Iako je spregnuti sustav LC-NMR dosta dobro međusobno sinkroniziran ipak postoje neka ograničenja samog sustava. Ograničenja spregnutog sustava LC-NMR su:

- količina uzorka za NMR ograničena je tekućinskom kromatografijom
- dio LC signala nalazi se unutar protočne NMR probe
- deuterirana otapala su vrlo skupa za kromatografiju
- nedeuterirana otapala daju jake pozadinske signale
- niska osjetljivost NMR-a¹

Nedostaci spregnutog sustava LC-NMR uglavnom se temelje na količini uzorka potrebnog za mjerenje. Za kromatografsko odjeljivanje potrebno je manje od 100 μg uzorka, dok je za NMR analizu najčešće potrebno više od 100 μg . Također jedan od problema je širenje pikova prilikom prijenosa iz kromatografske kolone u ćeliju NMR te samo razrjeđenje i onečišćenje uzorka. Srećom, navedeni problemi se ipak mogu smanjiti sprežanjem LC-NMR s ekstrakcijom na čvrstoj fazi. (LC-SPE-NMR).

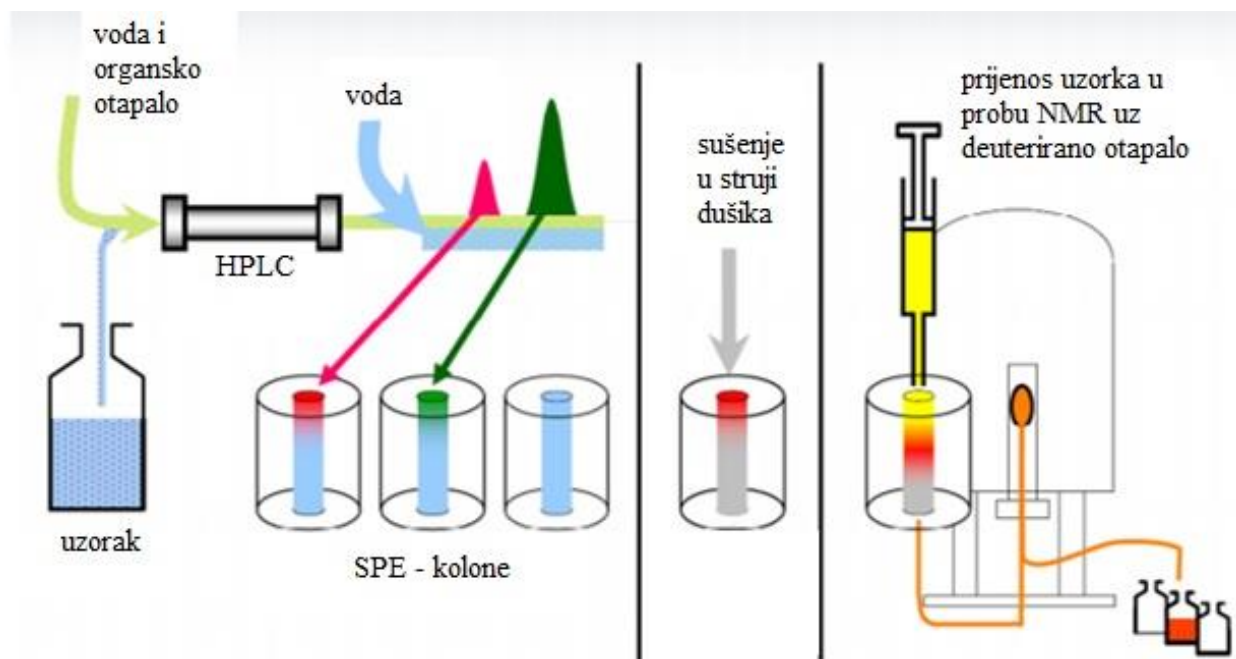
5.3. LC-SPE-NMR

Već spomenuti nedostaci i ograničenja spregnutog sustava LC-NMR mogu se umanjiti dodatnom spregom s ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE). Jedini uvjet za ekstrakciju na čvrstoj fazi je taj da se željeni uzorak dovoljno dugo može zadržati na SPE-koloni. To se može postići odgovarajućim odabirom stacionarne faze kojom su napunjene SPE-kolone. Za stacionarne faze mogu se koristiti čestice silikagela derivatizirane nepolarnim alifatskim skupinama, čestice aluminijske oksida različitih pH i slično. U praksi, metaboliti lijekova, onečišćenja lijekova i razgradni produkti lako se zadržavaju na SPE-koloni.¹ Kratke kromatografske kolone – SPE kolone – nalaze se između kromatografske kolone i ćelije NMR. Nakon kromatografskog odvajanja, pikovi se skladište u kolone SPE. Kolone se zatim suše u struji dušika kako bi se uklonilo otapalo. Za odvajanje komponenti u tekućinskoj kromatografiji koriste se nedeuterirana otapala, dok se za ispiranje uzorka s kolona SPE i za uvođenje u probu NMR koriste se deuterirana otapala. To je dosta ekonomično budući da su nedeuterirana otapala jeftinija od deuteriranih. Vrlo je bitno da se između uzorka i stacionarne faze stvore jake interakcije kako bi se izolirala što veća količina uzorka za snimanje spektara NMR. Nažalost, prilikom interakcija kolone SPE i uzorka može doći do neželjenih reakcija, stvaranja radikala i slično.

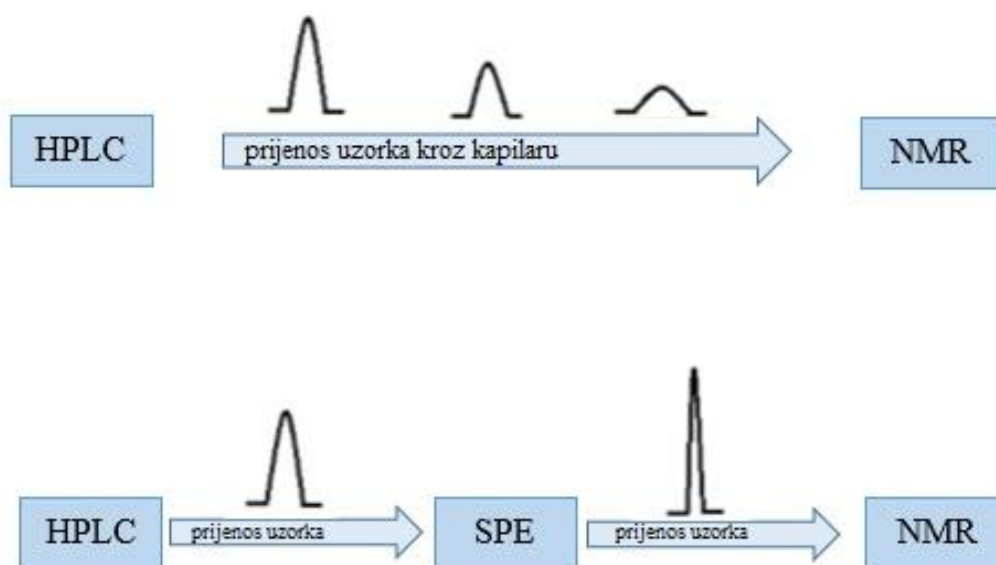
Važne prednosti spregnutog sustava LC-SPE-NMR jesu:

- Korištenje nedeuteriranih otapala umjesto deuteriranih
- Ukoncentriravanje uzorka
- Povećanje omjera signala i šuma
- Smanjenje vremena snimanja spektra NMR
- Sužavanje pikova prilikom prijenosa iz kromatografske kolone u ćeliju NMR

Shema spregnutog sustava LC-SPE-NMR prikazana je Slikom 13.



Slika 13. Shema spregnutog sustava LC-SPE-NMR.



Slika 14. Prijenos kromatografskog pika u tehnici LC-NMR (gore) i tehnici LC-SPE-NMR (dolje).

5.4. LC-MS

Osim sprezanja tekućinske kromatografije s nuklearnom magnetnom rezonancijom, tekućinsku kromatografiju može se spregnuti sa spektrometrom masa. Povezivanje tekućinskog kromatografa i spektrometra masa malo je zahtjevnija. Bitno je da se dijelovi spektrometra mase drže u vakuumu.

Spregnuta tehnika LC-MS može se koristiti za različite analize, ali se ipak najčešće koristi za analizu metabolita lijekova zbog velike osjetljivosti i dobrog razlučivanja.³

5.4.1. Načini izvedbe spregnutog sustva LC-MS

Ovisno o uzorku koji se analizira bitno je odabrati prigodnu analitičku tehniku, odnosno spregnuti sustav. U Tablici 5 navedene su tehnike za analizu različitih uzoraka.

Tablica 5. Podjela spregnutih sustava ovisno o analitu

UZORAK	KROMATOGRAFSKA MEDOTA	TEHNIKA IONIZACIJE	ANALIZATOR MASA
proteini peptidi oligonukleotidi oligosaharidi	tekućinska kromatografija (LC)	ionizacija elektroaspršenjem (ESI), ionizacija brzim atomima (FAB), matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)	analizator mase s magnetnim sektorom (B), kvadrupolni analizator mase (Q), analizator mase vremena leta (TOF)
polarni organski uzorci	plinska kromatografija (GC), tekućinska kromatografija (LC)	kemijska ionizacija (CI), ionizacija elektroaspršenjem (ESI)	analizator mase s magnetnim sektorom (B), kvadrupolni analizator mase (Q)
nepolarni organski uzorci	plinska kromatografija (GC)	kemijska ionizacija (CI), ionizacija	analizator mase s magnetnim sektorom

		elektroaspršenjem (ESI)	(B), kvadrupolni analizator mase (Q)
sintetički polimeri	/	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (MALDI)	analizator mase s magnetnim sektorom (B), analizator mase vremena leta (TOF)

Osim navedenih kombinacija tehnika pri sprezanju tekućinske kromatografije i spektrometra masa u novije vrijeme koriste se i složeniji sustavi. Do prije par godina pri analizi lijekova pažnja se obraćala samo na čistoću istih. Kasnije se pokazalo da to nije dovoljno te da se treba obratiti pažnja i na nečistoće lijekova. Zbog toga su se povećali propisi za kontrolu nečistoća (engl. *impurities*, IMP) i produkata degradacije (engl. *degradation products*, DP) u sastojcima lijekova i ostalih farmaceutskih proizvoda.³

Najpopularniji složeni spregnuti sustavi za karakterizaciju IMP i DP su:

- LC-MS (s pojedinačnim kvadrupolnim analizatorom masa)
- LC-MS-MS (s trostrukim kvadrupolnim analizatorom masa)
- LC-TOF
- LC-MS-TOF
- LC-Hybrid Trap TOF sustavi
- LC-FTICR

5.4.2. Nedostaci spregnutog sustava LC-MS

Iako spregnuti sustav LC-MS ima široku primjenu, kao i većina spregnutih sustava, on ima i nedostatke. Neki od nedostataka jesu ti da se analizom spregnutim sustavom LC-MS ne mogu vidjeti razlike u konformaciji uzorka odnosno nije moguće dobiti potpune informacije o strukturnim i optičkim izomerima.

Također, neke uzorke nije moguće analizirati koji su termonestabilni. Takvi uzorci se neće moći učinkovito ionizirati. Da bi se takve situacije izbjegle, koristi se nuklearna magnetna rezonancija.

5.5. LC-NMR-MS

Sprega nuklearne magnetne rezonancije s tekućinskom kromatografijom i spektrometrijom masa rezultira boljim podacima o nepoznatim spojevima pri pripravi lijeka ili samoj analizi međuprodukata i onečišćenja lijeka.

5.5.1. Razvoj spregnutog sustava LC-NMR-MS

1980-ih počelo je razvijanje spregnutih sustava poput LC-NMR kako bi se objasnila struktura objašnjena komponenata u smjesi ili nestabilnih tvari. Tih godina je tekućinska kromatografija prvi puta korištena kao metoda kvantitativne detekcije.¹ Krajem osamdesetih krenulo se u sprežanje više tehnika kako bi se povećala osjetljivost i preciznost instrumenata.

1995. F. S. Pullen i suradnici dizajnirali su prvi sustav LC-NMR-MS. Koristili su ga za analizu lijeka flukonazola i nekih triazola.¹⁰ 2004. godine znanstvenici tvrtke Brukera primijenili su spregnuti sustav LC-SPE-NMR-MS za analizu bioloških uzoraka.¹

Jedan od najistraženijih spregnutih sustava danas je spregnuti sustav tekućinske kromatografije s nuklearnom magnetnom rezonancijom i spektrometrom masa.^{1-4,10-11}

5.5.2. Prednosti spregnutog sustava LC-NMR-MS pred sustavima LC-NMR/LC-MS

Spregnuti sustav LC-NMR-MS omogućuje istovremenu analizu NMR i MS iz samo jedne kromatografske analize. Time je skraćeno vrijeme analize pa je stoga moguće brže i lakše analizirati složenije sustave.¹¹ Detektori NMR i MS daju rezultate koji se međusobno upotpunjuju, a njihovom kombinacijom omogućena je identifikacija uzoraka poput lijekova i onečišćenja te njihovih metabolita.

Još neke od prednosti spregnutog sustava LC-NMR-MS jesu¹:

- Brza i temeljita analiza strukture uzoraka
- Odlična tehnika za malo uzorka
- Povećani broj informacija u usporedbi s spregnutim sustavima LC-NMR ili LC-MS
- Odlična tehnika za strukturnu karakterizaciju komponenti poput nečistoća lijeka
- Molekulske mase i spektri NMR su najčešće dovoljni za potvrdu strukture nepoznatog produkta

5.5.3. Područja primjene spregnutog sustava LC-NMR-MS

Mnogi lijekovi u laboratorijskim uvjetima ne pokazuju nikakve moguće probleme za korisnika, ali tek pri kliničkoj upotrebi dolazi do nuspojava. Zbog nuspojava je velik broj lijekova povučen s tržišta.⁴ Stoga je vrlo bitno da se one spriječe, a to je moguće postići različitim analizama lijeka.

Najčešće primjene spregnutog sustava LC-NMR-MS su:

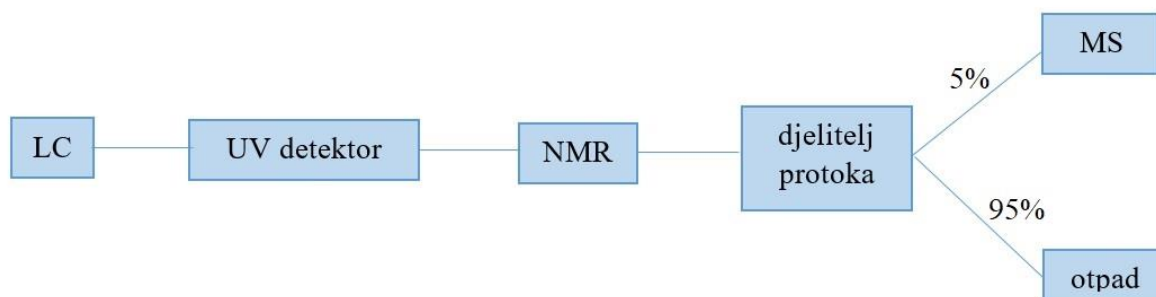
- Identifikacija i karakterizacija metabolita u fiziološkim tekućinama poput urina, krvi, žuči...
- Analiza sintetskih proizvoda
- Identifikacija onečišćenja ili razgradnih produkata u lijekovima ili sličnim kemijskim spojevima za koje je vrlo bitna čistoća uzorka

Urin štakora, najčešće ispitivani biološki fluid, relativno je jednostavno analizirati jer nisu potrebne komplicirane pripreme samog uzorka. Općenito, sama priprema uzorka za analizu spregnutim sustavom LC-NMR-MS najbitniji je korak u cijeloj analizi.

5.5.4. Način izvedbe spregnutog sustava LC-NMR-MS

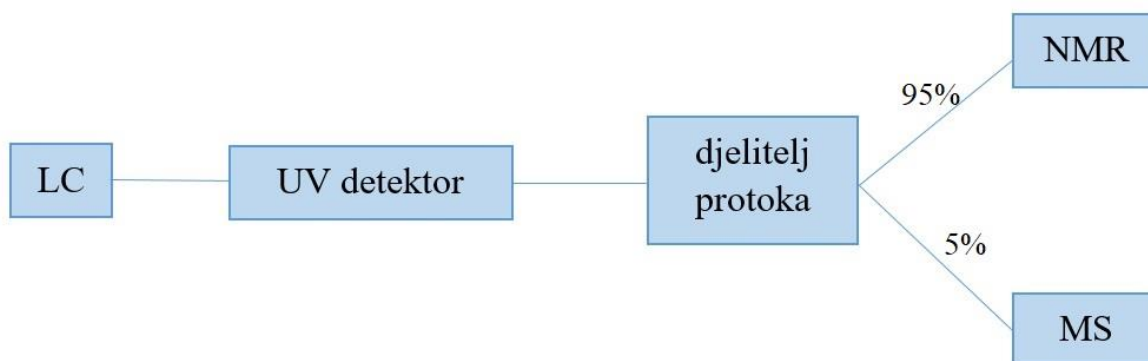
Povezivanje sustava nuklearne magnetne rezonancije i spektrometrije masa s tekućinskom kromatografijom moguće je ostvariti na dva načina: serijski i paralelno. U oba načina povezivanja cijela izvedba spregnutog sustava LC-NMR-MS u potpunosti je određena tehnikom koja se koristi u sustavu LC-NMR.

Pri serijskom načinu povezivanja sustava željeni uzorak s kromatografske kolone prvo ide u sprektar NMR, a zatim u spektrometar masa. Nakon obrade željenog uzorka, uzorak dolazi do djelitelja. Na djelitelju se 5% uzorka usmjerava na spektrometar masa, a ostalih 95% odlazi u otpad. Osim dijeljenja uzorka, druga uloga djelitelja je smanjiti protutlačni udar koji se može javiti u međuspoju.¹⁰ Shematski prikaz serijskog načina povezivanja LC-NMR-MS prikazan je slikom 15.



Slika 15. Serijski način povezivanja spregnutog sustava LC-NMR-MS.

Pri paralelnom načinu povezivanja djelitelj protoka usmjerava 5% uzorka na spektrometar masa, a preostalih 95% usmjerava na detektor NMR. Razlog takvom omjeru udjela uzorka na pojedine detektore je različita osjetljivost dva detektora. Manju osjetljivost ima detektor NMR. Druga uloga koju djelitelj ima u serijskom načinu povezivanja ovdje izostaje jer u paralelnom načinu povezivanja nema opasnosti od protutlačnog udara. Zbog toga, spektri NMR i MS mogu se snimati istovremeno. Shematski prikaz paralelnog načina povezivanja LC-NMR-MS prikazan je slikom 16.



Slika 16. Prikaz paralelnog povezivanja spregnutog sustava LC-NMR-MS.

U spregnutom sustavu LC-NMR-MS koriste se deuterirana otapala i za kromatografiju. Kao mobilna faza mogu se koristiti anorganski puferi. Anorganski puferi neće dati signale u NMR spektru. Međutim, anorganski puferi dosta slabo hlape te nisu povoljni za analizu spektrometrom masa. Naravno, postoje i idealni slučajevi u kojima se koriste deuterirani puferi, ali to često nije ekonomično.

§ 6. ZAKLJUČAK

Spregnuti sustavi u analizi lijekova u zadnje vrijeme su sve više i više zastupljeni. Sprezanje različitih tehnika omogućava kvalitetnu analizu raznih spojeva. Prvo su bili analizirani prirodni produkti i metaboliti lijekova. Za takve analize najčešće se koristio spregnuti sustav tekućinske kromatografije sa spektrometrom masa. Nuklearna magnetna rezonancija se prvo koristila za analizu izoliranih i čistih spojeva, no sprezanjem s drugim tehnikama njezina je uloga postala puno šira. Za identifikaciju bioloških spojeva potrebni su spektri NMR i MS. Zbog toga je spregnuti sustav LC-NMR-MS vrlo dobar odabir za analizu uzoraka te postaje *zlatni standard* u analizi smjesa.¹

Važnu ulogu spregnuti sustavi pronalaze u farmaceutskoj industriji. Vrlo je bitno da lijek koji se stavlja na tržište nije samo visoke čistoće nego da ima i što manji broj onečišćenja (IMP) i degradacijskih produkata (DP).

Svaki od spregnutih sustava, kao što je i navedeno, posjeduju i prednosti i nedostatke, stoga odabir sustava ovisi o prirodi istraživanog uzorka i njegovoj zastupljenosti.

Pametnim i inteligentnim povezivanjem različitih tehnika mogu se dobiti vrlo dobri spregnuti sustavi s različitim vrstama primjene. Time se ubrzava i znatno olakšava proces otkrivanja novih struktura, novih lijekova i njihovih onečišćenja.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. G. Schlotterbeck, S. M. Ceccareli, *Bianalysis*, **1(3)** (2009) str. 549-559
2. S. Singh, T. Handa, M. Narayanam, A. Sahu, M. Junwal, R. P. Shan, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**, (2012) 148-173.
3. Tolonen, A., Turpeinen, M., Pelkonen, O., Liquid chromatography-mass spectrometry in *in vitro* drug metabolite screening, *Drug Discov. Today*, **14** (2009), str. 120-133
4. O. Corcoran, M. Spraul, LC–NMR–MS in drug discovery, *DDT* **8**, (2003) 624-631
5. D. A. Skoog, D. M. West, J. Holler, *Osnove analitičke kemije*, Školska knjiga, Zagreb 1999, str. 645–674.
6. Interna skripta za Praktikum iz biokemije, 17. izdanje, Zagreb 2018.
7. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013. str. 1-2, 5
8. Albert, *On-line LC-NMR and Related Techniques*, Wiley, 2002.
9. P. Novak, T. Jednačak, *Strukturna analiza spojeva spektroskopskim metodama*, TIVA Tiskara Varaždin, Varaždin, 2013. str. 78 – 88.
10. I. Habinovec, *Spregnute tehnike u analizi metabolite lijekova*, Seminarski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
11. Yang, Z., Online hyphenated liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-mass spectrometry for drug metabolite and nature product analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **40** (2006), str. 516-527